

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE**

SOLIANY GRASSI MARAVAI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE CARNOSINA
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CÉREBRO DE RATOS**

CRICIÚMA, MARÇO DE 2014

SOLIANY GRASSI MARAVAI

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO
INTRACEREBROVENTRICULAR DE CARNOSINA
SOBRE PARÂMETROS DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
CÉREBRO DE RATOS**

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde
para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Patrícia
Fernanda Schuck

CRICIÚMA, MARÇO DE 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M311e Maravai, Soliany Grassi.

Efeitos da administração intracerebroventricular de carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos / Soliany Grassi Maravai ; orientadora: Patrícia Fernanda Schuck. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

54 p : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Carnosina. 2. Beta-Alamina. 3. Fadiga muscular.
4. Doença neurodegenerativas - Tratamento. I. Título.

CDD. 22ª ed. 613.282

Bibliotecária Rosângela Westrupp – CRB 14º/364
Biblioteca Central Prof. Eurico Back – UNESC

Folha Informativa

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e está apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo do Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense.

Dedico esse trabalho à minha família.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a Deus por me amparar nos momentos difíceis e me dar força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, que são meu porto seguro, estando sempre ao meu lado, me incentivando, acreditando nos meus sonhos... Com certeza, sem o apoio de vocês, eu não teria chegado ao término desta jornada. A vocês meu eterno amor.

À minha família, pelo apoio incondicional em todas as circunstâncias, fazendo-me forte para seguir em frente.

Agradeço à Prof.^a. Dr.^a. Patrícia Schuck, minha orientadora e exemplo de profissional. Obrigada pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela cordialidade e simpatia demonstradas, pela confiança que sempre me concedeu e pelo permanente estímulo que, por vezes, se tornaram decisivos em determinados momentos da elaboração desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Gustavo Ferreira pela preciosa ajuda na definição do objetivo deste estudo, pela exigência de método e rigor, pela incansável orientação científica e por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos colegas Ândrea, Marina e Hugo, que foram pessoas imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, ao qual compartilhamos ótimos momentos e que contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para a realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

Aos professores do PPGCS pelos ensinamentos.

Que Deus na sua infinita bondade abençoe a todos.

*“Aqueles que se sentem satisfeitos
sentam-se e nada fazem. Os insatisfeitos
são os únicos benfeitores do mundo.”*

Walter S. Landor

RESUMO

A carnosina (β -alanina-L-histidina) é um dipeptídeo encontrado em abundância na musculatura esquelética, no músculo cardíaco e no sistema nervoso central. É um composto utilizado como terapia adjuvante para o tratamento de doenças neurodegenerativas associadas ou não ao envelhecimento, devido ao seu conhecido efeito protetor contra oxidantes gerados na fisiopatologia dessas doenças. Entretanto, até o momento, nenhum estudo avaliou o efeito da administração isolada de carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos. Com o intuito de elucidar os efeitos antioxidantes da carnosina, este estudo investigou os efeitos da administração aguda intracerebroventricular (ICV) de carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos machos com 60 dias de vida. Para tanto, os animais foram submetidos a uma cirurgia estereotáxica com implantação de cânula no ventrículo lateral direito. Três dias após a cirurgia, os animais receberam uma administração única ICV de carnosina (6,4 μ mol) através da cânula guia. Os animais do grupo controle receberam 6,4 μ mol de NaCl em solução aquosa. Uma hora após a administração, os animais foram eutanasiados por decapitação com guilhotina e as estruturas cerebrais a serem estudadas foram limpas e dissecadas para posteriores análises bioquímicas. Para avaliação da oxidação lipídica e proteica, foram determinados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) e o conteúdo de sulfidrila, respectivamente. Também foram avaliadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) nas mesmas estruturas cerebrais. Observou-se que os níveis de TBA-RS não foram alterados em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas nos animais que receberam carnosina em comparação ao grupo controle. Por outro lado, o conteúdo de grupos sulfidrilas encontrou-se aumentado em cerebelo e hipocampo de ratos submetidos à administração de carnosina, sugerindo uma maior proteção conferida aos compostos tiólicos presentes nas células. Em relação às defesas antioxidantes, pôde-se observar um aumento da atividade da CAT em córtex cerebral dos animais que receberam administração ICV de carnosina. Tais resultados corroboram estudos anteriores que

demonstram efeitos antioxidantes para a carnosina. Entretanto, a administração ICV deste dipeptídeo ocasionou uma inibição da atividade da SOD em estriado, o que pode ser um efeito tóxico da carnosina. Tomados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram efeitos ambíguos da carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo. Este trabalho corrobora o efeito antioxidante descrito, mas apresenta uma evidência de um possível efeito tóxico exercido pela carnosina. Estudos complementares são necessários para avaliar a segurança do uso terapêutico desta molécula.

Palavras-chave: carnosina; cérebro; espécies reativas; antioxidante; rato.

ABSTRACT

Carnosine (β -alanine-L-histidine) is a dipeptide found in abundance in skeletal muscle, cardiac muscle and central nervous system. Based on the protective effect of carnosine against oxidative damage, its use was proposed as an adjuvant therapy for the treatment of neurodegenerative diseases associated or not with aging. However, up to date, no study has evaluated the effect of the isolated administration of carnosine on oxidative stress parameters in rat brain. In this study the effects of acute intracerebroventricular administration (ICV) of carnosine on oxidative stress parameters in cerebral cortex, cerebellum, hippocampus and striatum of male rats 60 days of age were investigated. The animals underwent a stereotactic surgery with implantation of cannula in the right lateral ventricle. Three days after surgery, animals received a single ICV administration of carnosine (6.4 μ mol) through the guide cannula. The control group received 6.4 μ mol NaCl in aqueous solution. One hour after administration, the animals were euthanized by decapitation with guillotine and brain structures to be studied were dissected and used for subsequent biochemical analyzes. It was observed that the levels of TBA-RS were not altered in any of the brain structures studied in animals receiving carnosine, as compared to the control group. On the other hand, the content of sulfhydryl groups found increased in cerebellum and hippocampus of rats after administration of carnosine, suggesting a greater protection toward thiol compounds present in the cells. It was also observed an increase in CAT activity in the cerebral cortex of animals receiving ICV administration of carnosine. These results corroborate previous studies that demonstrate antioxidant effects for carnosine. However, carnosine administration caused an inhibition of SOD activity in the striatum, which can be a toxic effect of carnosine. Taken together, the results in the present study demonstrate ambiguous effects for carnosine on oxidative stress parameters. Additional studies should be undertaken to assess the safety of the therapeutic use of this molecule.

Keywords: carnosine; brain; reactive species; antioxidant; rat.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Dipeptídeos de histidina e β -alanina, ligados entre si via ligação amida.....	16
Figura 2: Metabolismo da carnosina em tecidos.....	19
Figura 3: Reação química catalisada pelas isoformas da superóxido dismutase (SOD).....	27
Figura 4: Reação química catalisada pela enzima catalase (CAT).....	27
Figura 5: Reação química catalisada pela enzima glutathione peroxidase (GPx).....	27
Figura 6: Efeito da administração ICV de carnosina sobre os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS).....	35
Figura 7: Efeito da administração ICV de carnosina sobre o conteúdo de grupos sulfidril (SH).....	36
Figura 8: Efeito da administração ICV de carnosina sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	37
Figura 9: Efeito da administração ICV de carnosina sobre a atividade da enzima catalase (CAT).....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

AGE – Produtos finais da glicação avançada, do inglês *advanced glycation end-products*
ATP – Trifosfato de adenosina, do inglês *Adenosine triphosphate*
CAT – Catalase
CN1 – Carnosinase sérica
CN2 – Carnosinase citosólica
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CuZn-SOD – Superóxido dismutase citosólica
DBCA – Diretriz Brasileira para o Cuidado e Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos
DNA – Ácido desoxirribonucleico, do inglês *Desoxyribonucleic acid*
DTNB – Ácido ditionitrobenzóico, do inglês *5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid*
ER – Espécies reativas
ERN – Espécies reativas de nitrogênio
ERO – Espécies reativas de oxigênio
GABA - Ácido gama-aminobutírico, do inglês *Gamma-aminobutyric acid*
GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reductase
GSH – Glutathione Reduzida
IL-1 – Interleucina 1
ICV – Intracerebroventricular
LCR – Líquido cefalorraquidiano
MG – Metilglioxal
Mn-SOD – Superóxido dismutase mitocondrial
NO – Óxido nítrico, do inglês *Nitric Oxide*
PepT2 – Transportador de ampla especificidade para dipeptídeo, do inglês *PepT2 transporter*
pH - Potencial hidrogeniônico
SNC – Sistema nervoso central
SOD – Superóxido dismutase
TBA-RS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*
TGF-beta – Fator de transformação de crescimento beta, do inglês *Transforming growth factor beta*

TNB – Ácido tionitrobenzóico, do inglês *Thionitrobenzoic acid*

TNF-alfa – Fator de necrose tumoral alfa, do inglês *tumor necrosis factor alpha*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Carnosina	16
1.1.1. Metabolismo da Carnosina.....	17
1.1.2. Funções Biológicas da Carnosina.....	20
1.1.3. Toxicidade da Carnosina.....	22
1.2. Espécies Reativas (ER) e Estresse Oxidativo.....	23
1.2.1. Sistema de Defesa Antioxidante.....	25
1.2.2. Sistema de Defesas Antioxidantes Enzimáticas.....	26
1.2.3. Carnosina e Espécies Reativas.....	28
2. OBJETIVOS	29
2.1. Geral	29
2.2. Específicos	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1. Animais.....	30
3.1.1. Administração de Carnosina.....	30
3.2. Eutanásia e Preparação das Amostras.....	32
3.3. Parâmetros de Dano Oxidativo	32
3.3.1. Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS).....	32
3.3.2. Medida de Sulfidrilas Totais.....	33
3.4. Medida das Atividades de Enzimas Antioxidantes.....	33
3.4.1. SOD.....	33
3.4.2. CAT.....	33
3.5. Determinação de Proteínas	34
3.6. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO.....	39
6. CONCLUSÃO.....	43
7. PERSPECTIVAS.....	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXO.....	54

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carnosina

A carnosina (beta-alanina-L-histidina), a anserina (beta-alanina-1-metil-L-histidina) e a homocarnosina (gama-aminobutiril-L-histidina) (Figura 1) são os três dipeptídeos endógenos mais representativos do grupo dos dipeptídeos histidínicos (Peters et al., 2011). A anserina é um componente do músculo esquelético de aves, porém ausente em tecidos humanos (Boldyrev & Severin, 1990; De Marchis et al., 2000; Boldyrev, 2012). A homocarnosina é encontrada em grande quantidade no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos. A diferença das concentrações dos dipeptídeos pode ser explicada pela biodisponibilidade de ácido gama-aminobutírico (GABA), um precursor não proteinogênico da homocarnosina, que está presente exclusivamente em áreas cerebrais (Bellia et al., 2011).

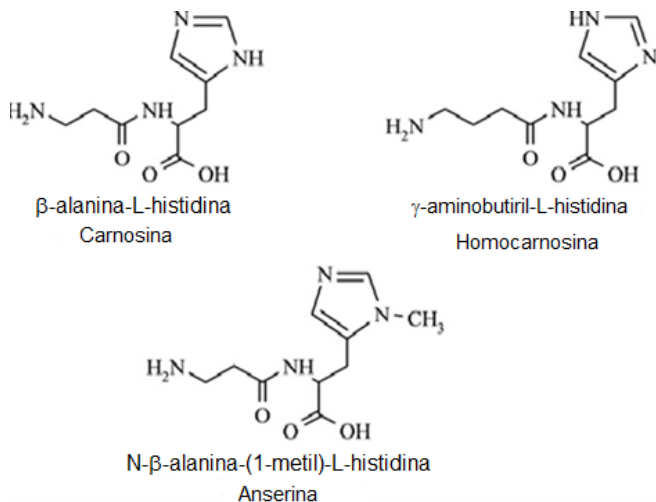


Figura 1: Dipeptídeos de histidina e β -alanina ligados entre si via ligação amida. (Figura adaptada de Bellia et al., 2011).

O dipeptídeo carnosina foi inicialmente isolado e purificado de extratos de músculos esqueléticos de vertebrados (Quinn et al., 1992) em 1900, por Vladimir Gulevistch, que também elucidou sua estrutura química (Boldyrev et al., 2010). A carnosina é encontrada em tecidos inervados, na musculatura esquelética, músculo cardíaco, pele, estômago e tecido nervoso (em algumas áreas específicas como neurônios e células da glia) (Quinn et al., 1992; Bauer, 2005; Di Paola et al., 2011), estando em concentrações de até 20 mM no músculo esquelético humano (Abe, 2000).

Estudos analíticos realizados em diferentes espécies de mamíferos estabeleceram que a carnosina é altamente concentrada no bulbo olfatório, e menores concentrações de carnosina e homocarnosina ocorrem no cérebro e no medula espinhal (Margolis, 1974; Margolis, 1980; Bonfanti et al., 1999; De Marchis, 2000).

1.1.1. Metabolismo da Carnosina

A carnosina é sintetizada em diversos tecidos a partir dos aminoácidos histidina e beta-alanina pela enzima carnosina sintetase (EC 6.3.2.11). Esta é uma enzima dependente de ATP com ampla especificidade ao seu substrato. É capaz de sintetizar homocarnosina e anserina, embora com uma afinidade mais baixa do que a relatada para carnosina (Horinishi et al., 1978). Essa enzima contém um domínio C-terminal, que compreende o sítio catalítico responsável pela ligação de beta-alanina com L-histidina e aminoácidos relacionados (Drozak et al., 2010).

Esta enzima é encontrada em maiores concentrações em tecidos excitáveis (SNC, musculatura esquelética e cardíaca) (Stuerenburg & Kunze, 1999; Sauerhofer et al., 2007). Estudos imuno-histoquímicos no SNC demonstraram que a carnosina aparece inicialmente em oligodendrócitos maduros e, posteriormente, nos demais tipos celulares, o que sugere que são essas células as responsáveis pela síntese de carnosina e homocarnosina nesse tecido (De Marchis et al., 2000).

Estudos *in vitro* com culturas primárias de células cerebrais demonstraram que a carnosina é sintetizada por células gliais (Bauer, 2005). Entre os sistemas de células investigados, astrócitos e oligodendrócitos estão envolvidos na localização da

carnosina na glia. No entanto, a ausência de carnosina sintetase em astrócitos demonstra que a carnosina e outros dipeptídeos histidínicos, nesse tipo celular, são internalizados por meio de um transportador (Dieck et al., 1999) denominado PepT2 (Xiang et al., 2006), que é um transportador saturável de alta afinidade e que apresenta ampla especificidade de substrato para dipeptídeos (Bauer, 2005). O mesmo sistema de transporte é expresso no pulmão, no baço e nos rins (Saito et al., 1996). Por outro lado, este transportador de peptídeos não é expresso em oligodendrócitos, em que a liberação de carnosina é especificamente estimulada por glutamato (Bakardjiev & Bauer, 2000). Portanto, a internalização deste dipeptídeo em oligodendrócitos tem sido atribuída a outros mecanismos de transporte, como a despolarização da membrana e a liberação vesicular dependente de cálcio (Bakardjiev & Bauer, 2000).

A presença de um beta-aminoácido (neste caso, a beta-alanina) na estrutura química da carnosina confere-lhe resistência à degradação pela maioria das peptidases. Assim, o catabolismo desses dipeptídeos (carnosina e compostos relacionados) é realizado por uma enzima conhecida como carnosinase (Figura 2) (Boldyrev et al., 2010). Essa enzima é considerada membro da família M20 das metaloproteinases, sendo específica para degradação de dipeptídeos (Balion et al., 2007). Duas isoformas principais foram caracterizadas em seres humanos: a carnosinase sérica (CN1, carnosinase sérica; EC 3.4.13.20) (Jackson et al., 1991), que é sintetizada no cérebro, secretada no líquido cefalorraquidiano (LCR) e, em seguida, para a circulação sistêmica (Lenney et al., 1982; Schoen et al., 2003). A outra isoforma é tecidual e presente no citosol (CN2; EC 3.4.13.3) (Lenney et al., 1985; Otani et al., 2005) e está presente em vários tecidos, incluindo fígado, rim e baço, exceto no músculo esquelético (Jackson et al., 1991).

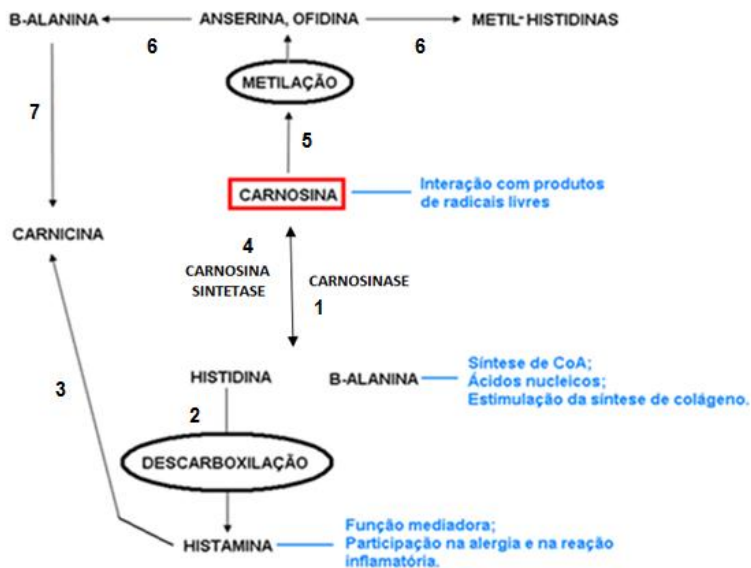


Figura 2: Metabolismo da carnosina em tecidos. (1) Carnosina é hidrolisada pela enzima carnosinase; (2) Histidina é descarboxilada formando histamina; (3) Histamina é precursora de carnicina; (4) Carnosina é sintetizada a partir dos aminoácidos (β -alanina e L-histidina) através da enzima carnosina sintetase; (5) Em aves, carnosina é metilada formando anserina; (6) Anserina é hidrolisada em metil-histidina e β -alanina; (7) β -alanina é precursora de carnicina em aves. Adaptada de Boldyrev e Severin (1990).

Essas enzimas não diferem apenas na sua distribuição e peso molecular, mas também na sua especificidade. Uma diferença importante é que a primeira (CN1) é bastante seletiva para dipeptídeos X-His, principalmente carnosina e homocarnosina em menor extensão, enquanto a segunda degrada um número maior de dipeptídeos (Teufel et al., 2003), exceto a homocarnosina (Lenney et al., 1983).

Dois íons metálicos são incluídos em ambas as enzimas, auxiliando o mecanismo catalítico. A carnosinase CN2 requer pelo menos um cátion Mn^{+2} equivalente para a atividade hidrolítica, enquanto a CN1 comumente age com Zn^{+2} e é ativada por Cd^{+2} . A CN1 é expressa no SNC dos adultos e em menor concentração no fígado (Teufel et al., 2003) e é secretada das células cerebrais para o plasma através do líquido

cefalorraquidiano (LCR). As concentrações dessa enzima sérica são indetectáveis nos recém-natos e aumentam com o avançar da idade, atingindo níveis próximos a dos adultos por volta de 10 a 12 anos (Fleisher et al., 1980; Hartlage, 1982; Lenney et al., 1982; Peters, 2011). Mamíferos não primatas, como os roedores, não produzem a CN1, não apresentando, portanto, essa atividade plasmática ou no SNC (Bellia et al., 2009).

Por outro lado, a CN2 é distribuída em vários tecidos humanos e no cérebro de roedores. Com base na localização pontual no cérebro dos mamíferos, esta isoforma pode ser usada, supostamente, como uma fonte de histidina para a síntese de histamina nos neurônios histaminérgicos (Biffo et al., 1990; Otani et al., 2005).

1.1.2. Funções Biológicas da Carnosina

A função e o metabolismo da carnosina não foram ainda totalmente elucidados. Sabe-se que este dipeptídeo atua como sequestrador de radicais hidroxila e possui ação antioxidante (Babizhayev et al., 1994; Chan & Decker, 1994; Hipkiss, 2009) por desempenhar um papel regulador no volume intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Boldyrev et al., 1987) e eliminar produtos de peroxidação de lipídeos, tais como os aldeídos insaturados (Kyriazis, 2010). Estudos demonstram que ratos pré-tratados com carnosina e que subsequentemente receberam etanol por via oral foram protegidos contra o aumento de peroxidação lipídica e do aumento sérico de transaminases hepáticas ocasionados por este álcool (Artun et al., 2010).

Depois de 100 anos de estudo da atividade biológica da carnosina, evidenciou-se que este peptídeo é um antioxidante endógeno, hidrofílico, que protege os tecidos excitáveis de animais contra o estresse oxidativo e pode ser usado com sucesso para impedir o dano oxidativo cerebral (Gallant et al., 2000). Assim, foi sugerido que a carnosina pode ser útil para o tratamento de pacientes com doenças neurodegenerativas (Hipkiss, 2007; Bellia et al., 2011) e prevenção do envelhecimento (Boldyrev, 2005).

Além disso, pode ainda regular a glicólise através de seu efeito ativador de algumas enzimas glicolíticas (Quinn et al., 1992). Em 1980, Ikeda e colaboradores demonstraram que a

carnosina estimula a atividade de frutose-1,6-bisfosfatase (EC 3.1.3.11). O mecanismo desta estimulação é desconhecido, mas pode ser devido à sua capacidade de quelar íons metálicos, tais como o Zn^{+2} e Mg^{+2} (Trombley et al., 2000), que regulam as enzimas glicolíticas. A ativação de frutose-1,6-bisfosfatase pode criar um ciclo fútil de ATP, diminuindo os níveis e a síntese desta molécula energética, assim como diminuindo o fornecimento de esqueletos de carbono para a síntese de aminoácidos (Hipkiss et al., 2013). Esta descoberta pode explicar os efeitos da carnosina em cultura de células tumorais demonstrado por Gaunitz e Hipkiss (2012). O dipeptídeo histidínico inibiu o crescimento celular decorrente de um declínio na síntese de ATP pela via glicolítica, que é a via preferencial de células tumorais por consumirem muito ATP devido a um acentuado índice mitótico (Gaunitz & Hipkiss, 2012).

A carnosina apresenta ação de tampão fisiológico através da sua forma acetilada, que ajuda diretamente a suprimir o aumento da concentração de íon hidrogênio, como também ativa a enzima anidrase carbônica (Temperini et al., 2005), que aumenta a capacidade do tampão bicarbonato. Também apresenta a propriedade de neutralizar a formação excessiva de ácido láctico durante o exercício anaeróbico de alta intensidade, evitando assim o decréscimo de pH citosólico (Abe, 2000).

Outros estudos demonstraram a capacidade da carnosina em inibir a glicosilação de proteínas (Hipkiss, 2009) por inativar especificamente o metilglioxal (MG) (Hipkiss et al., 2013). O MG é um aldeído reativo causador de glicosilação (Hipkiss, 2010; Hipkiss et al., 2013) que pode ser formado através da via glicolítica (pela decomposição espontânea da di-hidroxicetona fosfato ou sua conversão a MG pela enzima metilglioxal sintase) (Rose & Nowick, 2002), por hidroxilação da acetona via citocromo P450 e isoenzimas (Beisswenger et al., 2005), da oxidação aeróbica de aminoacetona, catalisada por íons de metais de transição (Dutra et al., 2001) ou ainda por uma aminoxidase sensível à semicarbazida (Yu et al., 2003). Quando os níveis séricos de glicose estão elevados, o MG também eleva suas concentrações (Uchiki et al., 2012) e é considerado a principal fonte de danos a proteínas, uma vez que podem formar adutos, conhecidos como produtos finais da glicação avançada (AGEs). A carnosina, então, se liga ao MG formando um aduto (MG-

carnosina) capaz de ser eliminado mais facilmente pela urina (Hipkiss et al., 2013). Além disso, a carnosina estimula a síntese de óxido nítrico (NO), estimula a proteólise, participa da desacetilação das histonas (Neurhro & Mantsch, 1979), estimula a síntese de proteínas de estresse e promove a cicatrização (Hipkiss, 2009).

A ação anti-inflamatória da carnosina provém da redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, tais como o fator de transformação de crescimento beta (TGF-beta), interleucina (IL) - 1 e fator de necrose tumoral (TNF)-alfa (Di Paola, 2011). Atua também na contração muscular e fosforilação oxidativa, estimula o sistema imune (Quinn et al., 1992), é um agente quelante especialmente de cobre, zinco (Quinn et al., 1992; Hipkiss, 2009), cálcio e purinas (Neurho & Mantsch, 1979), o que sugere o seu envolvimento na regulação gênica e transdução de sinal (Hipkiss, 1998).

Estudos em animais mostraram que a carnosina afeta a função neurológica por ser um peptídeo sintetizado pelo cérebro e os seus transportadores específicos estarem presentes no plexo coróide (Teuscher et al., 2004), parte da barreira hematoencefálica. Um possível papel para carnosina dentro do SNC é a modulação de neurônios glutamatérgicos sensoriais (Bonfanti et al., 1999). Tomonaga e colaboradores (2008) demonstraram que a carnosina exerce atividade antidepressiva em ratos (Tomonaga et al., 2008). Nesse sentido, em aves, a carnosina induz hiperatividade (Tsuneyoshi et al., 2007), enquanto que a sua estrutura inversa (L-histidina-beta-alanina) tem efeitos sedativos e hipnóticos (Tsuneyoshi et al., 2008).

A borda em escova renal também possui um sistema de transporte de carnosina e há evidências de que o rim apresenta carnosinase ativa (Sauerhofer et al., 2005). Outras evidências mostram que a carnosina pode influenciar a atividade do sistema nervoso simpático no rim (Tanida et al., 2005), bem como nos tecidos adiposos marrom e branco (Tanida et al., 2007).

1.1.3. Toxicidade da Carnosina

No homem, alterações no metabolismo desses dipeptídeos geralmente são devido a uma diminuição da atividade da carnosinase sérica, levando a um aumento das concentrações

plasmáticas, liquóricas e urinárias dos seus substratos (homocarnosina e carnosina) (Kramarenko et al., 2001). Desta forma, a carnosinemia ou deficiência da carnosinase (OMIM 212200) caracteriza-se como um erro inato do metabolismo com padrão de herança autossômica recessiva (Kramarenko et al., 2001). É provocada pela deleção na porção terminal do braço longo do cromossomo 18, com ponto de interrupção em 18q21.3, que culmina na deficiência ou ausência da atividade da carnosinase (Willi et al., 1997).

A deficiência de carnosinase sérica é acompanhada de tremor, convulsões mioclônicas, hipotonia, atraso psicomotor profundo e incapacidade de se envolver socialmente (Perry et al., 1967; Lunde et al., 1982). Uma redução da atividade da enzima CN1 pode, ainda, ser observada em transtornos neurológicos, tais como a doença de Parkinson, processos de isquemia, esclerose múltipla e doença de Alzheimer (Balion et al., 2007). Há, ainda, relatos sugerindo diferentes formas de deficiência enzimática. Alguns pacientes exibem uma atividade enzimática bastante reduzida associada a uma consequente carnosinemia, enquanto outros pacientes apresentam essa mesma redução, mas sem exibir a carnosinemia. Neste contexto, em alguns casos não foi evidenciada uma consistente relação entre esses achados bioquímicos e sintomas clínicos, o que demonstra que pacientes bioquimicamente pouco afetados se mostrariam clinicamente comprometidos (Fleisher et al., 1980).

1.2. Espécies Reativas (ER) e Estresse Oxidativo

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de nitrogênio (ERN), entre outras ER, é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições fisiológicas (Vasconcelos et al., 2007). O balanço *redox* em líquidos biológicos, organelas, células ou tecidos é determinado pela presença de pares *redox* responsáveis pelo fluxo de elétrons (Vasconcelos et al., 2007).

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (Halliwell, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres

moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (Ferreira & Matsubara, 1997).

A formação de ER constitui um processo contínuo e fisiológico, sendo a mitocôndria a principal fonte geradora de ER por meio da cadeia transportadora de elétrons. Tais mecanismos podem ser favorecidos pelos íons Cu^{+2} e Fe^{+2} por serem muito ativos em reações de óxido-redução (Koury & Donangelo, 2003; Scheneider & Oliveira, 2004). O ciclo *redox* desses minerais promove a reação de Fenton, a qual libera um potente radical hidroxila (OH^\cdot) a partir do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O OH^\cdot é capaz de retirar um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular e iniciar a peroxidação lipídica. O resultado é o acúmulo de hidroperóxidos que destroem a estrutura e função da membrana (Welch et al., 2002).

Entre as principais EROs, o ânion radical superóxido (O_2^\cdot) apresenta uma baixa capacidade de oxidação. Por outro lado, OH^\cdot mostra uma pequena capacidade de difusão, mas é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares (Anderson, 1996). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) não é considerado uma ER verdadeira, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (Anderson, 1996). Dentre as ERNs, destacam-se o NO, potente vasodilatador, porém, ao reagir com o oxigênio, forma o dióxido de nitrogênio (NO_2^\cdot) que é um potente iniciador de peroxidação lipídica em fluídos biológicos. O peroxinitrito (ONOO^\cdot), formado pela reação de O_2^\cdot com NO^\cdot , é instável e potente oxidante com propriedades semelhantes ao radical hidroxila, podendo causar danos a muitas moléculas biológicas, inclusive a grupos tiólicos das proteínas (Vasconcelos et al., 2007).

As EROs e ERNs, em baixas concentrações, exercem importantes funções biológicas, como na fagocitose, em que essas espécies são produzidas para eliminar o xenobiótico, resposta inflamatória, agentes estimulantes para processos bioquímicos intracelulares, geração de ATP, entre outros (Droge, 2002; Barbosa et al., 2010; Kunwar & Priyadarsini, 2011). Por outro lado, quando sua produção é exacerbada, o organismo dispõe de um eficiente sistema antioxidante que consegue controlar e restabelecer o equilíbrio. Porém, produções excessivas de ER podem desencadear danos oxidativos a biomoléculas como DNA,

proteínas e lipídios, podendo levar a mutações genéticas, disfunção e agregação de proteínas e comprometimento de membranas biológicas, resultando em doenças crônicas (Ferreira & Maturaba, 1997; Halliwell 2006; Halliwell & Gutteridge, 2007).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre agentes oxidantes e sistemas de defesas antioxidantes, em favor da produção excessiva de ER ou pelo detrimento de velocidade em remoção destas moléculas. Durante esse processo, ocorre a oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo a células e tecidos (Halliwell & Whiteman, 2004), além de contribuir para doenças como o câncer, hipertensão, diabetes, aterosclerose, envelhecimento precoce, doenças neurodegenerativas e erros inatos do metabolismo (Zelco et al., 2002; Ferrari, 2004; Halliwell & Whiteman, 2004; Halliwell & Gutteridge, 2007; Vasconcelos et al., 2007).

A intensidade e a patogenicidade deste desequilíbrio depende das concentrações de espécies pró e antioxidantes, das constantes de velocidade de reação com moléculas-alvo e da compartimentalização celular destes processos, em que fatores de solubilidade e difusão são determinantes (Grow & Ischiropoulos, 2001).

1.2.1. Sistema de Defesa Antioxidante

A produção contínua de ER durante os processos metabólicos é compensada mecanismos de defesa antioxidante, com função de neutralizar e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria destas moléculas (Clarkson & Thompson, 2000). Tais funções incluem a inibição da formação das ER (sistemas de prevenção) e o impedimento da ação desses (sistemas varredores), constituídos por glutathione reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD) (EC 1.15.1.1), catalase (CAT) (EC 1.11.1.6), glutathione peroxidase (GPx) (EC 1.11.1.9) e tocoferol. Podem ainda favorecer o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo), sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathione redutase (GR) (EC 1.6.4.2) e pela GPx, entre outros (Ferreira & Maturaba, 1997).

O excesso de ER no organismo é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. A deficiência dos sistemas antioxidantes pode ser resultado da diminuição da atividade das enzimas antioxidantes ou da deficiência nutricional de antioxidantes e de outros constituintes dietéticos essenciais (Halliwell & Gutteridge, 2000).

Esses agentes que protegem as células contra os efeitos das ER podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos. Os sistemas antioxidantes não-enzimáticos incluem compostos antioxidantes de origem dietética, como tocoferol (vitamina E), beta-caroteno (pro-vitamina A), selênio, cobre, zinco, ácido ascórbico e GSH (principal e mais abundante antioxidante não-enzimático do organismo) não vem da dieta, é sintetizado no organismo, que diminuem a ação tóxica das ER produzidas intra e extracelularmente (Yu, 1994). A avaliação do potencial antioxidante *in vivo* dos compostos não-enzimáticos dependem de algumas variáveis, como a absorção e biodisponibilidade em condições fisiológicas, concentração plasmática ideal, tipos de ER geradas no processo oxidativo, em qual compartimento celular foram geradas e como foram geradas (Bianchi & Antunes, 1999; Barbosa et al., 2010).

1.2.2. Sistema de Defesas Antioxidantes Enzimáticas

O principal sistema de defesa antioxidante é constituído por enzimas antioxidantes, como as SOD (CuZn-SOD - citosólica e extracelular, Mn-SOD - mitocondrial), CAT (heme-enzima) e GPx para decomporem, respectivamente, o ânion O_2^- , H_2O_2 e lipoperóxidos (Yu, 1994). A GR é outra enzima importante nesse processo. Esta enzima, mesmo não agindo diretamente na remoção de ER, é responsável pela regeneração da GSH, utilizada como substrato pela enzima GPx. Essas enzimas agem por meio de mecanismos de prevenção, impedindo e/ou controlando a formação de ER (Schneider & Oliveira, 2004).

A isoformas citosólicas da SOD (CuZn-SOD) é dimérica e também pode ser encontrada nos lisossomos, núcleo e espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (tetramérica). A Mn-SOD é localizada na mitocôndria (Zelco et al., 2002; Vasconcelos et al., 2007). A equação abaixo demonstra a reação catalisada pelas isoformas da SOD (Figura 3).

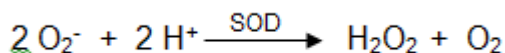


Figura 3: Reação química catalisada pelas isoformas da superóxido dismutase (SOD). O radical superóxido é dismutado em peróxido de hidrogênio e em oxigênio molecular. Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

Outro importante antioxidante enzimático é a CAT, que se encontra na maioria das células humanas. Esta enzima catalisa a degradação do peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água (Figura 4). Seu sítio ativo contém o grupo heme e está localizada nos peroxissomos. A CAT é também encontrada nas mitocôndrias das células do tecido cardíaco (Vasconcelos, 2007). No entanto, alguns órgãos como coração, músculo esquelético e cérebro contêm baixa atividade da CAT, o que os tornam mais vulneráveis à ação das EROs e ERNs (Halliwell & Gutteridge, 2007).

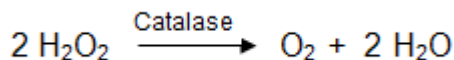


Figura 4: Reação química catalisada pela enzima catalase. Degradação do peróxido de hidrogênio a oxigênio molecular e água. Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

Outra enzima que degrada o peróxido de hidrogênio é a GPx (Figura 5) (Ferreira & Abreu, 2007). A GPx está localizada no citosol e na matriz mitocondrial, atuando sobre peróxidos em geral, com utilização de GSH como cofator (Vasconcelos et al., 2007).

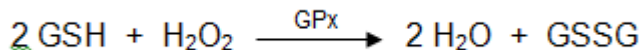


Figura 5: Reação química catalisada pela enzima glutathiona peroxidase (GPx). Glutathiona reduzida e peróxido de hidrogênio são oxidados a água e glutathiona oxidada. Fonte: Vasconcelos et al., 2007.

1.2.3. Carnosina e Espécies Reativas

A carnosina demonstrou atividade contra a geração de ER na mucosa do intestino delgado, possivelmente por sua capacidade em quelar zinco (Omatsu et al., 2010). Acredita-se que esta capacidade da carnosina em extinguir ER possa ser a responsável por benefícios anti-inflamatórios, como a redução do citocromo *c* e da caspase 3 (Omatsu et al., 2010).

Muitos estudos demonstraram que, tanto a nível de tecido como de organelas, a carnosina e dipeptídeos relacionados podem prevenir a lipoperoxidação (Dupin et al., 1984). Estes estudos sugerem que eles representam homólogos hidrossolúveis de antioxidantes lipossolúveis (como o tocoferol) capaz de diminuir a suscetibilidade de danos oxidativos a membranas celulares (Quinn et al., 1992).

A carnosina também apresenta efeito protetor contra danos de ER em isquemia cerebral, verificado em um estudo utilizando dois modelos animais de lesão cerebral isquêmica em que a carnosina aumentou o tempo até à perda da excitabilidade e diminuiu o tempo de recuperação (Boldyrev et al., 1997).

Outros possíveis mecanismos antioxidantes da carnosina ainda estão sob investigação.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar os efeitos da administração intracerebroventricular (ICV) aguda de carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo em estruturas cerebrais.

2.2. Específicos

- Investigar os efeitos da administração ICV aguda de carnosina sobre o dano oxidativo lipídico (níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias de vida;
- Investigar os efeitos da administração ICV aguda de carnosina sobre o dano proteico (conteúdo de grupos sulfidrila) em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias de vida;
- Investigar os efeitos da administração ICV aguda de carnosina sobre as defesas antioxidantes celulares enzimáticas (SOD e CAT) em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos com 60 dias de vida.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados quinze ratos (considerando-se a mortalidade devido à cirurgia) machos da espécie *Rattus norvegicus*, da linhagem Wistar, de 60 dias de vida e provenientes do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Os animais foram mantidos em ciclos de claro-escuro de ± 12 horas a uma temperatura de $24 \pm 1^\circ\text{C}$ e com exaustão. Os animais tiveram livre acesso à água e ao alimento. A utilização dos animais seguiu o protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais desta Universidade (protocolo nº 141/2012), levando em consideração a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos (DBCA), aprovada por meio da Portaria do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) nº 465 (23/05/2013).

Todos os procedimentos foram realizados por pessoas treinadas e qualificadas em local específico para manipulação animal.

3.1.1. Administração de Carnosina

Para a administração ICV de carnosina, foi realizada uma cirurgia estereotáxica e implantação de uma cânula no ventrículo lateral direito por trepanação. Durante o processo cirúrgico, a temperatura foi mantida adequada (aproximadamente 21°C) para o conforto dos animais. Os animais foram inicialmente anestesiados com cloridrato de cetamina (DCB nº 01936) (75 mg/kg , intramuscular) e cloridrato de xilazina (DCB nº 09208) (75 mg/kg , intramuscular) para a realização da cirurgia estereotáxica e implantação da cânula. Após a anestesia, os animais foram colocados em um aparelho estereotáxico (Insight®, Brasil) sobre um pano limpo, para evitar o contato direto com o material metálico frio do equipamento, presos nas barras auriculares, de forma a permitir a leitura adequada das coordenadas. A seguir, realizou-se uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo, expondo a calota craniana. Utilizaram-se algumas gotas de peróxido de hidrogênio

(Dinâmica®) a fim de retirar a camada restante do tecido subcutâneo e permitir a melhor visualização das suturas; o excesso foi retirado com auxílio de uma tesoura cirúrgica. A torre do aparelho estereotáxico foi colocada em posição vertical (ângulo zero), com o intuito de se verificar as coordenadas para a correta implantação da cânula no ventrículo lateral direito. A localização obtida, levando-se em consideração as coordenadas anteroposterior 0,9 mm e mesolateral 1,5 mm a partir do bregma, indicou onde seria implantada a cânula. Para tanto, foi realizado um pequeno orifício no local determinado utilizando-se a caneta de alta rotação de um aparelho de brocar utilizado por odontólogos (Marathon®) e uma cânula de 9 mm foi introduzida com o auxílio do aparelho estereotáxico, seguindo a coordenada dorsoventral -2,6 mm. Esta foi fixada na calota craniana com acrílico odontológico, formando um “capacete”. Os animais foram, então, devolvidos às suas gaiolas e mantidos no biotério da instituição. Durante as 72 horas seguintes à cirurgia, os animais permaneceram em recuperação pós-cirúrgica. Nenhum fármaco analgésico foi utilizado, pois seu uso poderia interferir nos parâmetros bioquímicos a serem avaliados.

Os animais que permaneceram com a cânula intacta foram divididos em 2 grupos experimentais: grupo controle e grupo carnosina, com no mínimo 5 animais por grupo. No dia da administração, foi preparada uma solução 1,6 M de carnosina (sem DCB/DCI) dissolvida em solução salina e seu pH foi ajustado para 7,4. Da mesma forma, uma solução NaCl (DCB 02421) 1,6 M foi preparada no dia da administração e seu pH foi ajustado para 7,4.

Em seguida, os animais receberam carnosina (6,4 μ mol; 4 μ L de uma solução de carnosina 1,6 M) por via ICV inserindo-se uma agulha na cânula implantada. Os animais do grupo controle receberam 4 μ L da solução de NaCl 1,6 M, para que a mesma osmolaridade fosse mantida tanto no grupo carnosina quanto no grupo controle.

Uma hora após a administração, foram dissecados o córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado para a determinação dos parâmetros de estresse oxidativo.

3.2. Eutanásia e Preparação das Amostras

A eutanásia dos animais seguiu as Diretrizes para Prática de Eutanásia (portaria 596 do CONCEA, publicada em 26/06/2013).

Uma hora após a administração dos fármacos, os animais foram mortos por decapitação com guilhotina e sem anestesia, a caixa craniana foi aberta por craniotomia e as estruturas cerebrais foram expostas. O bulbo olfatório e o tronco cerebral foram desprezados. Subsequentemente, foram dissecados e limpos o córtex cerebral, o cerebelo, o hipocampo e o estriado, sendo retirado o excesso de sangue dos vasos externos e a substância branca das vias descendentes.

Os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato de potássio 40 mM contendo KCl 120 mM, pH 7,4 e centrifugados a 750 x g a 4°C por 10 minutos, para descartar o núcleo e os detritos celulares (Evelson et al., 2001). Após a centrifugação, o sobrenadante foi coletado e o sedimento, descartado. O sobrenadante foi utilizado para posteriores análises bioquímicas.

3.3. Parâmetros de Dano Oxidativo

3.3.1. Níveis de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS)

Os níveis de TBA-RS foram determinados de acordo com o método de Esterbauer e Cheeseman (1990). Ácido tricloroacético 10% foi adicionado ao sobrenadante. Após centrifugação, o sobrenadante foi tratado com ácido tiobarbitúrico 0,67 % na proporção de 1:1. A mistura foi levada a um banho fervente durante 25 min e, após, resfriada em água à temperatura ambiente. A absorvância obtida através da coloração rósea resultante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm. Concomitantemente, foi feita uma curva de calibração com 1,1,3,3-tetrametoxipropano, na qual todos os pontos foram tratados da mesma forma que as amostras. Os resultados foram expressos como nmol TBA-RS.mg de proteína⁻¹.

3.3.2. Medida de Sulfidrilas Totais

Este parâmetro foi realizado de acordo com o método de Aksenov e Markesbery (2001). A oxidação dos tióis livres da amostra leva à formação de pontes dissulfeto. O ácido ditionitrobenzóico (DTNB), reagente de cor, é reduzido pelos tióis não oxidados, gerando um derivado amarelo ácido tionitrobenzóico (TNB), lido espectrofotometricamente a 412 nm. Com isso o método determina os tióis totais da amostra. Os resultados estão expressos em nmol de TNB.mg de proteína⁻¹.

3.4. Medida das Atividades de Enzimas Antioxidantes

3.4.1. SOD

A atividade da SOD foi analisada por medição da inibição da auto-oxidação da adrenalina, lido a 505 nm como descrito previamente por Bannister e Calabrese (1987). Os resultados da atividade da SOD estão expressos em UI.mg de proteína⁻¹.

3.4.2. CAT

Foi determinada a atividade desta enzima segundo Aebi (1984). Ao sobrenadante foi adicionado Triton X 100 0,1% seguido de agitação e esta mistura foi conservada em gelo durante 15 minutos. Em tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 foi adicionado H₂O₂ 30% (v/v). Este meio foi transferido para uma cubeta de quartzo e o aparelho estabilizado contra um branco corrido separadamente de tampão fosfato. Após a adição da amostra, foi realizada a leitura da queda da absorvância do H₂O₂ em espectrofotômetro a 240 nm, à temperatura ambiente (22 °C ± 2), durante 100 segundos. Para o cálculo da CAT, utilizou-se o coeficiente de extinção do H₂O₂ de 43,6 mM⁻¹cm⁻¹. Os resultados da atividade da CAT estão expressos em UI.mg de proteína⁻¹.

3.5. Determinação de Proteínas

A determinação das concentrações de proteínas totais foi feita segundo o método de Lowry (1951), utilizando-se albumina sérica bovina como padrão.

3.6. Análise Estatística

Considerando-se dois grupos experimentais e a distribuição normal dos dados, a análise estatística utilizada foi o teste *t de Student* para amostras independentes. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa *Statistica* versão 7.0. Foram consideradas diferenças significativas quando o valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

Inicialmente, avaliou-se o efeito da administração ICV de carnosina sobre os níveis de TBA-RS em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos de 60 dias de vida (Figura 6). Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos controle e carnosina em nenhuma das estruturas avaliadas.

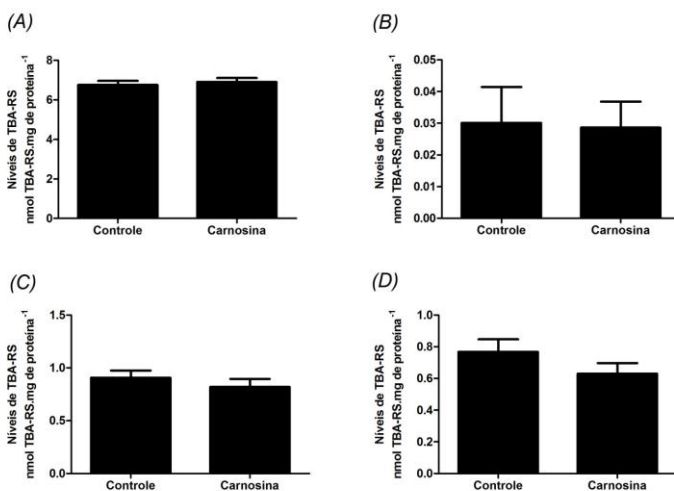


Figura 6. Efeito da administração intracerebroventricular de carnosina sobre os níveis das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA-RS) em córtex cerebral (A), cerebelo (B), hipocampo (C) e estriado (D) de ratos de 60 dias de vida. Os resultados estão expressos como nmol TBA-RS.mg de proteína⁻¹ e os dados representam média \pm erro padrão da média para 5 experimentos independentes realizados em triplicata. Não foi observada nenhuma diferença significativa entre os grupos (teste *t* de Student para amostras independentes).

A seguir, investigou-se os efeitos *in vivo* da carnosina sobre o dano proteico através da medida do conteúdo de grupos sulfidríla em estruturas cerebrais em ratos submetidos à administração ICV de carnosina em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos de 60 dias de vida (Figura 7). Observou-se um aumento estatisticamente significativo no conteúdo de grupos sulfidríla em cerebelo e hipocampo de

animais que receberam carnosina. Nas demais estruturas, não houve diferença significativa entre os grupos.

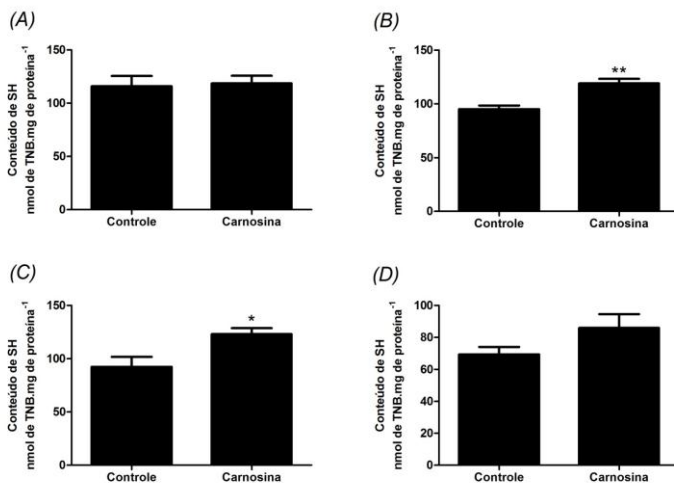


Figura 7. Efeito da administração intracerebroventricular de carnosina sobre o conteúdo de grupos sulfidríla (SH) em córtex cerebral (A), cerebelo (B), hipocampo (C) e estriado (D) de ratos de 60 dias de vida. Os resultados estão expressos como nmol TNB.mg de proteína⁻¹ e os dados representam média \pm erro padrão da média para 5 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student para amostras independentes).

O próximo passo foi avaliar a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos de 60 dias submetidos à administração ICV de carnosina. A Figura 8 demonstra uma inibição estatisticamente significativa da atividade desta enzima nos animais do grupo que receberam carnosina, em comparação aos animais do grupo controle. Nas demais estruturas cerebrais não foram observadas nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

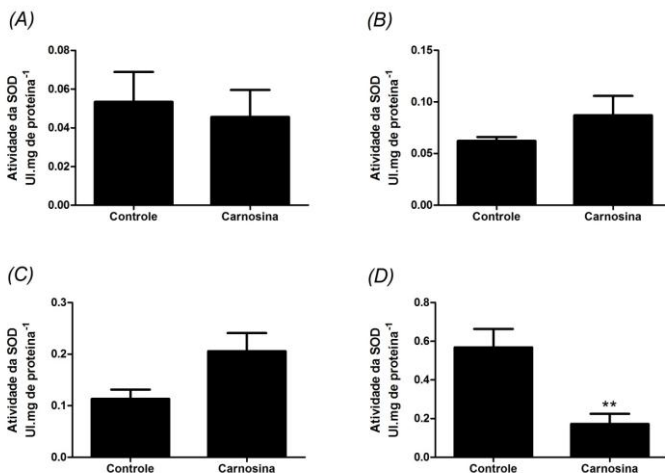


Figura 8. Efeito da administração intracerebroventricular de carnosina sobre a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) em córtex cerebral (A), cerebelo (B), hipocampo (C) e estriado (D) de ratos de 60 dias de vida. A atividade está expressa em UI.mg de proteína⁻¹ e os dados representam média \pm erro padrão da média para 5 experimentos independentes realizados em triplicata. ** $p < 0,01$ em comparação ao grupo controle (teste *t* de Student para amostras independentes).

Finalmente, foi avaliada a atividade da enzima CAT em córtex cerebral, cerebelo, hipocampo e estriado de ratos de 60 dias de vida que receberam administração ICV de carnosina. Na Figura 9, pode-se observar um aumento da atividade desta enzima em córtex cerebral dos animais que receberam carnosina, quando comparado ao grupo controle.

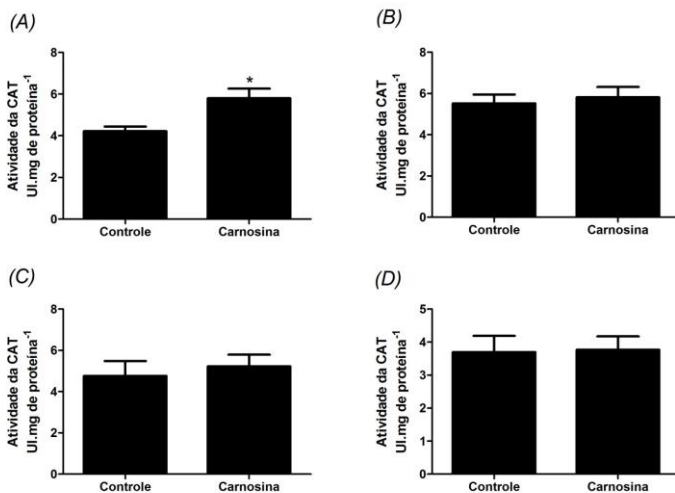


Figura 9. Efeito da administração intracerebroventricular de carnosina sobre a atividade da enzima catalase (CAT) em córtex cerebral (A), cerebelo (B), hipocampo (C) e estriado (D) de ratos de 60 dias de vida. A atividade está expressa em UI.mg de proteína⁻¹ e os dados representam média \pm erro padrão da média para 5 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0,05$ em comparação ao grupo controle (teste t de Student para amostras independentes).

5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, a carnosina foi administrada ICV isoladamente em animais sem prévia manipulação, com o intuito de se investigar os efeitos deste composto em um organismo saudável. Observou-se que esta administração provocou efeitos diversos nas diferentes estruturas cerebrais. A administração de carnosina não aumentou o dano lipídico basal (controle) em nenhuma das estruturas cerebrais avaliadas, como observado pela quantificação dos níveis de TBA-RS. Considerando-se que a literatura descreve atividade antioxidante para este composto, este seria um resultado esperado.

Da mesma forma, a administração ICV de carnosina não alterou o conteúdo de grupos sulfidrila em córtex cerebral e estriado dos animais. Entretanto, nos mesmos animais, este dipeptídeo protegeu os grupos sulfidrila de oxidação em cerebelo e hipocampo, corroborando o efeito antioxidante da carnosina observado. Compostos tiólicos (contendo grupo sulfidrila) possuem como centro reacional ao menos um grupo sulfidrila. O estado *redox* das sulfidrilas nas células está envolvido em diversos processos de sinalização, de transcrição e também nas vias mediadas pelas EROs (Dalle-Donne et al., 2008).

O efeito protetor contra a oxidação de sulfidrilas pode ser em função de dois fatores principais. Primeiramente, proteínas que contêm aminoácidos com grupos tiólicos (como cisteína e metionina) são facilmente oxidáveis, levando à geração de pontes dissulfeto (Stadtman & Levine, 2003) ou suscetíveis à formação de adutos com metais pesados (Halliwell & Gutteridge, 2007). Muitas dessas proteínas são enzimas cujo sítio ativo possui resíduos com sulfidrilas essenciais para a catálise. É importante salientar que aproximadamente 85% dos grupos sulfidrila quantificados pelo método utilizado no presente trabalho correspondem a proteínas (Aksenov & Markesbery, 2001), o que pode sugerir uma proteção contra o dano oxidativo proteico basal (controle) e, assim, aumentando o conteúdo de grupos sulfidrila. Para confirmar essa proteção contra o dano oxidativo a proteínas, dever-se-ia avaliar o conteúdo de grupos carbonila (específico de proteínas).

O segundo fator que pode explicar esse aumento da integridade de grupos tióis é um possível aumento nas

concentrações teciduais de GSH. A GSH é o principal composto celular não proteico rico em grupos sulfidril, os quais são essenciais para sua atividade antioxidante, tanto direta (protegendo moléculas de oxidação em detrimento dos seus grupos tióis) quanto indireta (como substrato para enzimas antioxidantes) (Ferreira & Maturaba, 1997). Esta molécula é o mais abundante e importante antioxidante não-enzimático do organismo e atua na manutenção do estado *redox* celular e defendendo o organismo contra xenobióticos (Meister, 1995; Rossi et al., 1995; Griffith, 1999; Vasconcelos et al., 2007). Caso a carnosina estimule a atividade de enzimas regeneradoras de GSH (como a GR) ou inibindo enzimas que utilizam GSH como substrato (como a GPx), tal fato poderia levar a uma preservação de GSH e, conseqüentemente, aumentando o conteúdo total de grupos sulfidril (Griffith, 1999). Entretanto, mais estudos são necessários no sentido de se investigar os mecanismos pelos quais a carnosina atua protegendo grupos tióis.

Outro mecanismo pelo qual a carnosina pode atuar como antioxidante é através da alteração das atividades de enzimas antioxidantes. Neste sentido, no presente trabalho, foi observado que a administração ICV do dipeptídeo levou a um aumento da atividade da enzima CAT em córtex cerebral, em comparação ao grupo que recebeu solução salina. Tal fato pode representar um mecanismo protetor, aumentando a degradação do peróxido de hidrogênio à água e, assim, impedindo o efeito deste oxidante e inibindo a formação do radical hidroxila, a ER mais tóxica (Vasconcelos et al., 2007).

Por outro lado, um aumento da atividade da CAT poderia ocorrer em resposta a um aumento de peróxido de hidrogênio, substrato da enzima. Neste caso, a carnosina induziria um aumento na produção de ER e, como mecanismo de compensação, levaria indiretamente ao aumento da atividade da enzima (Ferreira & Maturaba, 1997). Entretanto, esta última hipótese parece não ser apropriada, visto que um aumento na produção de ER provavelmente induziria dano oxidativo a biomoléculas (Halliwell & Gutteridge, 2007), o que não foi observado neste trabalho. Estes dados estão em consonância com um estudo anterior de Crema (2013), em que animais que receberam administração aguda intraperitoneal de carnosina apresentaram uma maior atividade da CAT em córtex cerebral.

Macedo (2013) verificou que animais submetidos à administração aguda intraperitoneal de carnosina apresentaram um aumento da atividade dos complexos I-III e II-III da cadeia transportadora de elétrons, bem como da enzima succinato desidrogenase em córtex cerebral. Estes achados estão de acordo com os efeitos antioxidantes aqui apresentados, visto que um aumento da atividade mitocondrial, especialmente da transferência de elétrons, favorece uma menor produção de ER (Koury & Donangelo, 2003). Os resultados descritos por Macedo sugerem um mecanismo adicional para a atividade antioxidante da carnosina.

Observou-se uma inibição da atividade da SOD, enzima responsável pela dismutação do ânion superóxido, produzido pela redução incompleta do oxigênio molecular (Anderson, 1996), em estriado de animais que receberam carnosina. Este efeito pode ser em decorrência a um aumento de outros antioxidantes como da GSH e da CAT, assim diminuindo os níveis de ER e consequentemente pode haver uma diminuição da SOD pela não necessidade da mesma em estar na sua máxima atividade. Além disso, Guerreiro e colaboradores (2010) constataram que a relação SOD/CAT diminuída é favorável para a sobrevivência de pacientes com sepse e que o aumento da atividade da SOD está significativamente relacionada a não sobreviventes. Este pode ser, portanto, mais um mecanismo antioxidante da carnosina.

No entanto, este pode ser um efeito tóxico da carnosina, visto que uma inibição da SOD induz um aumento das concentrações de ânion superóxido, ocasionando dano oxidativo a biomoléculas. Tal efeito seria prejudicial à homeostase do estado *redox* celular (Halliwell & Gutteridge, 2007). Diferentemente dos achados deste trabalho, Crema (2013) observou um aumento da atividade da SOD em animais que receberam administração intraperitoneal repetida de carnosina. Tal fato poderia ocorrer em decorrência de uma inibição inicial (aguda), mas que a sustentação de níveis altos de carnosina levaria a uma compensação. Também deve-se levar em consideração a provável diferença de concentração de carnosina atingida nos diferentes tratamentos, visto que a administração ICV garante maiores concentrações cerebrais do dipeptídeo em comparação à administração intraperitoneal da mesma substância.

Torna-se importante salientar que o estriado, estrutura em que houve inibição da SOD pela administração de carnosina, é a estrutura cerebral mais suscetível ao dano oxidativo, considerando-se o baixo conteúdo de enzimas antioxidantes (especialmente a CAT) e seu alto conteúdo de ferro (Halliwell & Gutteridge, 2007). Portanto, uma inibição da atividade da SOD nesta estrutura poderia trazer consequências catastróficas. Entretanto, não se observou aumento de dano oxidativo a biomoléculas neste trabalho, o que seria esperado em consequência da inibição da SOD.

Gemelli e colaboradores (2013) avaliaram a atividade das enzimas CAT e SOD em córtex cerebral de ratos após a administração subcutânea de β -alanina (aminoácido constituinte da carnosina) e constataram também um aumento da atividade da enzima CAT e uma inibição da enzima SOD. Estes autores relacionaram este efeito ao aumento do conteúdo de ER, o que levaria a um desequilíbrio entre antioxidantes e pró-oxidantes, gerando assim o estresse oxidativo. Seria plausível sugerir que a estrutura química da β -alanina na carnosina seria responsável por tais efeitos. Por outro lado, deve-se considerar que a β -alanina é um β -aminoácido liberado pela hidrólise da carnosina (Boldyrev et al., 2010), e o aumento nas atividades das enzimas antioxidantes CAT e inibição da SOD tenha ocorrido como resposta a uma elevação de ER secundário a um possível aumento dos níveis teciduais de β -alanina.

Uma hipótese para os efeitos ambíguos da carnosina demonstrados no presente trabalho poderia ser um aumento da atividade CAT em compensação a um aumento de H_2O_2 , podendo este atuar em duas reações químicas (Halliwell, 2006). Primeiramente, o H_2O_2 pode reagir com Fe^{+2} na reação de Fenton, formadora de hidroxilas. Este OH^\cdot pode inibir a SOD e, assim, prejudicar o sistema de dismutação da O_2^\cdot em H_2O_2 , acumulando O_2^\cdot . A segunda reação envolve altas concentrações de O_2^\cdot , que reage com o H_2O_2 acumulado, produzindo OH^\cdot na reação de Haber-Weiss (Anderson, 1996). Este OH^\cdot pode reagir com pontes dissulfeto de proteínas, aumentando o conteúdo de SH (Halliwell, 2006; Valko et al., 2007). Tal efeito resultaria em uma mudança na atividade de enzimas que contém grupos tióis, como muitas cinases envolvidas na fosforilação em cascatas de transdução de sinais (Gemelli et al., 2013). Esta hipótese indica um possível

efeito tóxico da carnosina quando em concentrações acima das fisiológicas, como é verificado na carnosinemia, doença cujos pacientes apresentam um comprometimento cerebral considerável (Perry et al., 1967; Lunde et al., 1982; Balion et al., 2007).

A carnosina tem sido utilizada como tratamento adjuvante de diversas doenças neurodegenerativas provocadas por agentes externos e/ou doenças relacionadas ao envelhecimento (Kohen et al., 1988; Hipkiss et al., 2013). De acordo com Stvolinsky e colaboradores (1996), a carnosina também pode atuar como neuroprotetor, preservando as células nervosas contra danos que podem levar à morte celular durante a isquemia cerebral. Entretanto, pouco se sabe sobre os efeitos tóxicos desse dipeptídeo histidínico.

O presente trabalho demonstra pela primeira vez o efeito direto e isolado da carnosina sobre parâmetros de estresse oxidativo.

6. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, os resultados apresentados nesta dissertação demonstraram efeitos ambíguos do dipeptídeo histidínico carnosina, podendo ser interpretados de forma positiva ou negativa. Isto indica a importância de se rever o risco/benefício do uso de compostos como este na terapia de doenças que acometem o SNC. São necessários mais estudos para esclarecer os mecanismos pelos quais a carnosina atua e, assim, avaliar os efeitos tóxicos e/ou neuroprotetores deste peptídeo e a segurança de seu uso terapêutico.

7. PERSPECTIVAS

Para melhor esclarecer a proteção contra o dano oxidativo a proteínas, é interessante avaliar o conteúdo de grupos carbonila (específico de proteína) e de demais sistemas antioxidantes, como níveis de GSH e atividade da GPx, após administração ICV aguda em ratos com 60 dias de vida submetidos ao mesmo protocolo experimental.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe H. Role of histidina-related compounds as intracellular proton buffering in vertebrate muscle. *Biochem.* 2000; 65(7):757-765.

Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984; 125:121-126.

Aksenov MY, Markesbery WR. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 2001; 302(2-3):141-145.

Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res.* 1996; 350(1):103-108.

Artun BC, Kusku-Kiraz Z, Gulluoglu M, Cevikbas U, Koçak-Toker N, Uysal M. The effect of carnosine pretreatment on oxidative stress and hepatotoxicity in binge ethanol administered rats. *Hum Exp Toxicol.* 2010; 29(8):659-665.

Babizhayev MA, Seguin MC, Gueyne J, Evstigneeva RP, Ageyeva EA, Zheltukhina GA. L-carnosine (beta-alanyl-L-histidine) and carcinine (beta-alanylhistamine) act as natural antioxidants with hydroxyl-radical-scavenging and lipid-peroxidase activities. *Biochem J.* 1994; 304(2):509-516.

Bakardjiev A, Bauer K. Biosynthesis, release, and uptake of carnosine in primary cultures. *Biochem.* 2000; 65(7):779-782.

Balioni CM, Benson C, Raina PS, Papaioannou A, Patterson C, Ismaila AS. Brain type carnosinase in dementia: a pilot study. *BMC Neurol.* 2007; 5:7-38.

Bannister JV, Calabrese L. Assays for superoxide dismutase. *Meth Biochem Anal.* 1987; 32:279-312.

Barbosa K, Costa N, Alfenas R, De Paula S, Minim V, Bressan J. Estresse oxidativo: conceitos, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutri.* 2010; 23(4):629-643.

Bauer K. Carnosine and homocarnosine, the forgotten, enigmatic peptides of the brain. *Neurochem Res.* 2005; 30(10):1339-4135.

Beisswenger BG, Delucia EM, Lapoint N, Sanford RJ, Beisswenger PJ. Ketosis leads to increased methylglyoxal

production on the Atkins diet. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1043:201-210.

Bellia F, Calabrese V, Guarino F, Cavallaro M, Cornelius C, De Pinto V, Rizzarelli E. Carnosine levels in aging brain: redox state induction and cellular stress response. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11(11):2759-2775.

Bellia F, Vecchio G, Cuzzocrea S, Calabrese V, Rizzarelli E. Neuroprotective features of carnosine in oxidative driven diseases. *Mol Aspects Med.* 2011; 32(4-6):258-266.

Bianchi MLP, Antunes, LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Rev Nutr.* 1999; 12(12):123-130.

Biffo S, Grillo M, Margolis FL. Cellular localization of carnosine-like and anserine-like immunoreactivity in rodent and avian central nervous system. *Neuroscience.* 1990; 35(3):637-651.

Boldyrev AA. Carnosine: new concept for the function of an old molecule. *Biochem.* 2012; 77(4):313-326.

Boldyrev AA, Dupin AM, Bunin AY, Babizhaev M, Severin S. The antioxydative properties of carnosine, a natural histidine containing dipeptide. *Biochem Int.* 1987; 15(6):1105-1113.

Boldyrev AA. Protection of proteins from oxidative stress: A new illusion or a novel strategy? *Ann NY Acad Sci.* 2005; 1057:193-205.

Boldyrev A, Severin S. The histidine-containing dipeptides, carnosine and anserine: distribution, properties and biological significance. *Adv Enzym Regul.* 1990; 30:175-194.

Boldyrev AA, Stvolinsky SL, Fedorova TN, Suslina ZA. Carnosine as a natural antioxidant and geroprotector: from molecular mechanisms to clinical trials. *Rejuvenation Res.* 2010; 13(2-3):156-158.

Boldyrev AA, Stvolinsky SL, Tyulina OV, Koshelev VB, Hori N, Carpenter DO. Biochemical and physiological evidence that carnosine is an endogenous neuroprotector against free radicals. *Cell Mol Neurobiol.* 1997; 17(2):259-271.

Bonfanti L, Peretto P, De Marchis S, Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in the mammalian brain. *Prog Neurobiol.* 1999; 59(4):333-353.

Chan KN, Decker EA. Endogenous skeletal muscle antioxidants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1994; 34(4):403-426.

Clarkson PM, Thompson HS. Antioxidants: what role do they play in physical activity and health? *Am J Clin Nutr*. 2000; 72(2):637-646.

Crema FB. Efeitos in vivo da carnosina sobre processos de oxidações biológicas. [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2013.

Dalle-Donne I, Milzani A, Gagliano N, Colombo R, Giustarini D, Rossi R. Molecular mechanisms and potential clinical significance of S-glutathionylation. *Antioxid Redox Signal*. 2008; 10(3):445-473.

De Marchis S, Modena C, Peretto P, Migheli A, Margolis FL, Fasolo A. Carnosine-related dipeptides in neurons and glia. *Biochem*. 2000; 65(7):824-833.

Dieck ST, Heuer H, Ehrchen J, Otto C, Bauer K. The peptide transporter PepT2 is expressed in rat brain and mediates the accumulation of the fluorescent dipeptide derivative beta-Ala-Lys-Nepsilon-AMCA in astrocytes. *Glia*. 1999; 25(1):10-20.

Di Paola R, Impellizzeri D, Salinaro AT, Mazzon E, Bellia F, Cavallaro M, Cornelius C, Vecchio G, Calabrese V, Rizzarelli E, Cuzzocrea S. Administration of carnosine in the treatment of acute spinal cord injury. *Biochem Pharmacol*. 2011; 82(10):1478-1489.

Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82(1):47-95.

Drozak J, Veiga-da-Cunha M, Vertommen D, Stroobant V, Van Schaftingen E. Molecular identification of carnosine synthase as ATP-grasp domain-containing protein 1 (ATPGD1). *J Biol Chem*. 2010; 285(13):9346-9356.

Dupin AM, Boldyrev AA, Arkhipenko IuV, Kagan VE. Carnosine protection of Ca^{2+} transport against damage induced by lipid peroxidation. *Bull Eksp Biol Med*. 1984; 98(8):186-188.

Dutra F, Knudsen FS, Curi D, Bechara EJ. Aerobic oxidation of aminoacetone, a threonine catabolite: iron catalysis and coupled iron release from ferritin. *Chem Res Toxicol*. 2001; 14(9):1323-1329.

Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 1990; 186:407-421.

Evelson P, Travacio M, Repetto M, Escobar J, Llesuy S, Lissi EA. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. *Arch Biochem Biophys.* 2001; 388(2):261-266.

Ferrari B. Functional foods, herbs and nutraceuticals: towards biochemical mechanisms of health aging. *Bioger.* 2004; 5(5):275-279.

Ferreira A, Matsubara L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revass Med Bras.* 1997; 43(1):61-68.

Ferreira ICRF, Abreu RMV. Estress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise.* 2007; 4(2):32-39

Fleisher LD, Rassin DK, Wisniewski K, Salwen HR. Carnosinase deficiency: a new variant with high residual activity. *Pediatr Res.* 1980; 14(4):269-271.

Gallant S, Kukley M, Stvolinsky S, Bulygina E, Boldyrev A. Effect of carnosine on rats under experimental brain ischemia. *Tohoku J Exp Med.* 2000; 191(2):85-99.

Gauntitz F, Hipkiss AR. Carnosine and cancer: a perspective. *Amino acids.* 2012; 43(1):135-142.

Gemelli T, de Andrade RB, Rojas DB, Bonorino NF, Mazzola PN, Tortorelli LS, Funchal C, Dutra Filho CS, Wannmacher CMD. Effects of b-alanine administration on selected parameters of oxidative stress and phosphoryl transfer network in cerebral cortex and cerebellum of rats. *Mol Cell Biochem.* 2013; 380(1-2):161-170.

Griffith OW. Biological and pharmacological regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med.* 1999; 27(9-10):922-925.

Grow AJ, Ischiropoulos HJ. Nitric oxide chemistry and cellular signaling. *J Cell Physiol.* 2001; 187(3):277-282.

Guerreiro MO, Petronilho F, Andrades M, Constantino L, Mina FG, Moreira JC, Dal-Pizzol F, Ritter C. Plasma superoxide dismutase activity and mortality in septic patients. *J Trauma.* 2010; 69(6):102-106.

Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev.* 1994; 52(8):253-265.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 4th ed. Clarendon Press: Oxford; 2007.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *Am J Clin Nutr.* 2000; 75(5):1082-1087.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006; 97(6):1634-1658.

Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142(2):231-255.

Hartlage PL, Roesel RA, Eller AG, Hommes FA. Serum carnosinase deficiency: decreased affinity of the enzyme for the substrate. *J Inher Metab Dis.* 1982; 5(1):13-14.

Hipkiss AR. Aging, Proteotoxicity, mitochondria, glycation, NAD and carnosine: possible inter-relationships and resolution of the oxygen paradox. *Front Aging Neurosci.* 2010; 18:2-10.

Hipkiss AR. Carnosine and its possible roles in nutrition and health. *Adv Food Nutr Res.* 2009; 57:87-154.

Hipkiss AR. Carnosine, the protective, anti-aging peptide? *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; 30(8):863-868.

Hipkiss AR, Cartwright SP, Bromley C, Gross SR, Bill RM. Carnosine: can understanding its actions on energy metabolism and protein homeostasis inform its therapeutic potential? *Chem Cent J.* 2013; 7(1):38.

Hipkiss AR. Could Carnosine or related structures suppress Alzheimer's disease? *J Alz Dis.* 2007; 11(2):229-240.

Horinishi H, Grillo M, Margolis FL. Purification and characterization of carnosinesynthetase from mouse olfactory bulbs. *J Neurochem.* 1978; 31(4):909-919.

Ikeda T, Kimura K, Hama T, Tamaki N: Activation of rabbit muscle fructose1,6-bisphosphatase by histidine and carnosine. *J Biochem.* 1980; 87:179-185.

Jackson MC, Kucera CM, Lenny JF. Purification and properties of human serum carnosinase. *Clin Chim Acta.* 1991; 196(2-3):193-205.

Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC, Ames BN. Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3175–3179.

Koury JC, Donangelo CM. Zinco, estresse oxidativo e atividade física. *Rev Nutr.* 2003; 16(4):433-441.

Kramarenko GG, Markova ED, Ivanova-Smolenskaya IA, Boldyrev AA. Peculiarities of carnosine metabolism in a patient with pronounced homocarnosinemia. *Bull Exp Biol Med.* 2001; 132:450-454.

Kunwar A, Priyadarsini K. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J Med Alli Sci.* 2011; 1(2):53-60.

Kyriazis M. Anti-ageing potential of carnosine: approaches toward successful ageing. *Drug Discov Today Ther strateg.* 2010; 7(3):45-49.

Lenney JF, George RP, Weiss AM, Kucera CM, Chan PW, Rinzler GS. Human serum carnosinase: characterization, distinction from cellular carnosinase, and activation by cadmium. *Clin Chim Acta.* 1982; 123(3):221-231.

Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM, George RP. Characterization of human tissue carnosinase. *Biochem J.* 1985; 228(3):653-660.

Lenney JF, Peppers SC, Kucera-Orallo CM, Sjaastad O. Homocarnosinosis: lack of serum carnosinase is the defect probably responsible for elevated brain and CSF homocarnosine. *Clin Chim Acta,* 1983; 132(2):157-165.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J Biol Chem.* 1951; 193:265-275.

Lunde H, Sjaastad O, Gjessing L. Homocarnosinosis: hypercarnosinuria. *J Neurochem,* 1982; 38(1):242-245.

Macedo LW. Avaliação dos efeitos da carnosina sobre parâmetros do metabolismo energético no córtex cerebral de ratos jovens. [Dissertação de mestrado]. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Criciúma: Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2013

Margolis FL. Carnosine: an olfactory neuropeptide. In: Baker JL, Smith T, editores. *The Role of Peptides in Neuronal Function*. New York: Dekker; 1980. p. 545–572.

Margolis FL. Carnosine in the primary olfactory bulb. *Science*. 1974; 184(4139):909–911.

Meister A. Glutathione metabolism. *Meth Enzimol*. 1995; 251:3-7.

Neurhro KJ, Mantsch HH. Complex formation of carnosine with purine nucleotides in aqueous solution. *Z Naturforsch C*. 1979; 35(7-8):557-561.

Omatsu T, Naito Y, Handa O, Mizushima K, Hayashi N, Qin Y, Harusato A, Hirata I, Kishimoto E, Okada H, Uchiyama K, Ishikawa T, Takagi T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Yoshikawa T. Reactive oxygen species-quenching and anti-apoptotic effect of polaprezinc on indomethacin-induced small intestinal epithelial cell injury. *J Gastroenterol*. 2010; 45(7):692-702.

Otani H, Okumura N, Hashida-Okumura A, Nagai K. Identification and characterization of a mouse dipeptidase that hydrolyzes L-carnosine. *J Biochem*. 2005; 137(2):167–175.

Perry TL, Hansen S, Tischler B, Berry K. Carnosinemia: a new metabolic disorder associated with neurologic disease and mental defect. *N Engl J Med*. 1967; 277(23): 1219-1227.

Peters V, Jansen EEW, Jakobs C, Riedl E, Janssen B, Yard BA, Wedel J, Hoffmann GF, Zschocke J, Gotthardt D, Fischer C, Köppel H. Anserine inhibits carnosine degradation but in human serum carnosinase (CN1) is not correlated with histidine dipeptide concentration. *Clin Chim Acta*. 2011; 412:263-267.

Quinn PJ, Boldyrev AA, Formazuyk VE. Carnosine: Its Properties, Functions an Potential Therapeutic Applications. *Molec Aspects Med*. 1992; 13(5):379-444.

Rose IA, Nowick JS. Methylglyoxal synthetase, enol-pyruvaldehyde, glutathione and the glyoxalase system. *J Am Chem Soc*. 2002; 124(44):13047-13052.

Rossi R, Cardaioli E, Scaloni A, Amigoni G, Di Simplicio P. Thiol groups in proteins as endogenous reductants to determine glutathione-protein mixed disulphides in biologicak systems. *Biochim Biophys Acta*. 1995; 1243:230-238.

Saito H, Terada T, Okuda M, Sasaki S, Inui K. Molecular cloning and tissue distribution of rat peptide transporter PEPT2. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1280(2): 173–177.

Sauerhofer S, Bartram CR, Nawroth P, Hammes HP, Yard BA, Zschocke J, Van der Woude FJ. Carnosine as a protective factor in diabetic nephropathy: Association with a leucine repeat of the carnosinase gene CNDP1. *Diabetes*. 2005; 54(8):2320–2327.

Sauerhofer S, Yuan G, Braun GS, Deinzer M, Neumaier M, Gretz N, Floege J, Kriz W, van der Woude F, Moeller MJ. L-carnosine, a substrate of carnosinase-1, influences glucose metabolism. *Diabetes*. 2007; 56:2425–2432.

Schneider D, Oliveira R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *RBME*. 2004; 10(10):308–313.

Schoen P, Everts H, Boer T, Oeveren WV. Serum carnosinase activity in plasma and serum: validation of a method and values in cardiopulmonary bypass surgery. *Clin Chem*. 2003; 49(11):1930–1932.

Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acids residues in proteins. *Amino acids*. 2003; 25(3-4):207–218.

Stuerenburg HJ, Kunze K. Concentrations of free carnosine (a putative membrane-protective antioxidant) in human muscle biopsies and rat muscles. *Arch Gerontol Geriatr*. 1999; 29:107–113.

Stvolinsky SL, Sousa S, Pontesh E, Sergienko V, Boldyrev AA. Immunomodulating effects of carnosine in vivo and in vitro experiments. *Membr Cell Biol*. 1996; 10:323–330.

Tanida M, Gotoh H, Taniguchi H, Otani H, Shen J, Nakamura T, Tsuroka N, Kiso Y, Okumura N, Nagai K. Effects of central injection of L-carnosine on sympathetic nerve activity innervating brown adipose tissue and body temperature in rats. *Regul Pept*. 2007; 144(1-3):62–71.

Tanida M, Nijima A, Fukuda Y, Sawai H, Tsuruoka N, Shen J, Yamada S, Kiso Y, Nagai K. Dose-dependent effects of L-carnosine on the renal sympathetic nerve and blood pressure in urethane-anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005; 288(2):447–455.

Temperini C, Scozzafava A, Puccetti L, Supuran C. Carbonic anhydrase activators: X-ray crystal structure of the adduct of human isozyme II with histidine as a platform for the design of stronger activators. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15(23):5136–5141.

Teufel M, Saudek V, Ledig JP, Bernhardt A, Boularand S, Carreau A, Cairns NJ, Carter C, Cowley DJ, Duverger D, Ganzhorn AJ, Guenet C, Heintzelmann B, Laucher V, Sauvage C, Smirnova T. Sequence identification and characterization of human carnosinase and a closely related non-specific dipeptidase. *J Biol Chem.* 2003; 278(8):6521–6531.

Teuscher NS, Shen H, Shu C, Xiang J, Keep RF, Smith DE. Carnosine uptake in rat choroids plexus primary cell cultures and choroids plexus whole tissue from PEPT2 null mice. *J Neurochem.* 2004; 89(2):375–382.

Tomonaga S, Yamane H, Onitsuka E, Yamada S, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M. Carnosine-induced antidepressant-like activity in rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 2008; 89(4):627–632.

Trombley PQ, Horning MS, Blakemore LJ: Interactions between carnosine and zinc and copper: implications for neuromodulation and neuroprotection. *Biochem.* 2000, 65:807–816.

Tsuneyoshi Y, Tomonga S, Asechi M, Morishita K, Denbow DM, Furuse M. Central administration of dipeptides, beta-alanyl-BCAAs, induces hyperactivity in chicks. *BMC Neurosci.* 2007; 8:37–42.

Tsuneyoshi Y, Yamane H, Tomonga S, Morishita K, Denbow DM, Furuse M. Reverse structure of carnosine-induced sedative and hypnotic effects in chick under stress. *Life Sci.* 2008; 82(21–22):1065–1069.

Uchiki T, Weikel KA, Jiao W, Shang F, Caceres A, Pawlak D, Handa JT, Brownlee M, Nagaraj R, Taylor A: Glycation-altered proteolysis as a pathobiologic mechanism that links dietary glycemic index, aging, and age-related disease (in nondiabetics). *Aging Cell.* 2012; 11:1–13.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39:44–84.

Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato MS, Kubota LT. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim Nova*. 2007; 30(5):1323-1338.

Welch KD, Davis TZ, Van Eden ME, Aust SD. Deleterious iron-mediated oxidation of biomolecules. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:577-583.

Willi SM, Zhang Y, Hill JB, Phelan MC, Michaelis RC, Holden KR. A deletion in the long arm of chromosome 18 in a child with serum carnosinase deficiency. *Pediatr Res*. 1997; 41(2):210-213.

Xiang J, Hu Y, Smith DE, Keep RF. PEPT2-mediated transport of 5-aminolevulinic acid and carnosine in astrocytes. *Brain Res*. 2006; 1122(1):18-23.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*. 1994; 74:139-161.

Yu PH, Wright S, Fan EH, Lun ZR, Gubisne-Harberle D. Physiological and pathological implications of semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochim Biophys Acta*. 2003; 1647(1-2):193-199.

Zelco I, Mariani T, Folz R. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Rad Biol Med*. 2002; 33(3):337-349.

ANEXO – Carta de Aprovação da CEUA

**Resolução**

A Comissão de Ética no Uso de Animais, normatizada pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 141/2012

Professor Responsável: Gustavo Costa Ferreira.

Equipe: Patrícia Fernanda Schuck, Emilio Luiz Streck, Daniele Guilhermano Machado, Liliane Borges Rodrigues, Hugo Galvani Zapelini, Cinara Ludwig Gonçalves, Soliany Grassi Maravai, Fernanda Malgarin Silva, Nádia Webber Dimer, Juliana Priscila Martins da Costa e Bruna Dalsasso Pizzato.

Título: "Avaliação da toxicidade da administração intracerebroventricular de carnosina sobre a homeostase energética e parâmetros de estresse oxidativo e neuroquímicos em cérebro de ratos."

Este projeto foi **Aprovado** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Foi autorizada a utilização no total de 480 Ratos Wistar (7, 15, 30 e 60 dias de idade). Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos em que constam como pesquisadores. Para demais dúvidas, contatar a CEUA pelo e-mail ceua@unesp.net.

The animal research Ethics Committee, sanctioned by the resolution number 02/2011/Câmara Propex, in accordance with federal law number 11.794, has analyzed the following Project:

Protocol number: 141/2012

Principal Investigator: Gustavo Costa Ferreira.

Researchers: Patrícia Fernanda Schuck, Emilio Luiz Streck, Daniele Guilhermano Machado, Liliane Borges Rodrigues, Hugo Galvani Zapelini, Cinara Ludwig Gonçalves, Soliany Grassi Maravai, Fernanda Malgarin Silva, Nádia Webber Dimer, Juliana Priscila Martins da Costa e Bruna Dalsasso Pizzato.

Project title: "Assessment of carnosine toxicity on central nervous system according to energy metabolism, oxidative stress and neurochemical parameters in rat brain".

The project was **Approved** in its ethical and methodological aspects. Any alteration of the original version of this project must be previously submitted to the Committee for further analyzes. May you have further questions, please contact us on www.unesp.net/propex/ceua or by e-mail: ceua@unesp.net.

Criciúma, 03 de dezembro de 2012.


Patrícia Fernanda Schuck

Coordenadora da CEUA